

# 氨基糖甙类抗生素 JI-20A 发酵培养条件的研究\*

陈剑锋<sup>1,2</sup> 张元兴<sup>2</sup> 郭养浩<sup>1\*\*</sup> 李建基<sup>1</sup>

(福州大学药物生物技术与工程研究所 福州 350002)<sup>1</sup>

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)<sup>2</sup>

**摘要:** 研究了氨基糖甙类抗生素 JI-20A 分批发酵培养基和发酵工艺的优化。结果表明发酵培养基的优化组成为玉米淀粉 60g/L, 花生饼粉 30g/L, 麦芽糖 10g/L, 玉米浆 8g/L, 复合无机盐适量, 淀粉酶适量, 蛋氨酸 1g/L 和氯化钴 6 $\mu$ g/mL。控制消后培养基 pH 值和氧的供应条件有助于抗生素 JI-20A 产生菌的菌体生长和产物合成。

**关键词:** 氨基糖甙类抗生素, 抗生素 JI-20A, 发酵, 培养基, 优化

**中图分类号:** TQ465.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0028-07

## OPTIMIZATION OF THE MEDIUM AND PROCESS PARAMETERS IN BATCH AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTIC JI-20A FERMENTATION

CHEN Jian-Feng<sup>1,2</sup> ZHANG Yuan-Xing<sup>2</sup> GUO Yang-Hao<sup>1\*\*</sup> LI Jian-Ji<sup>1</sup>

(*Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002*)

(*State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237*)

**Abstract:** The medium and process parameters were optimized in batch aminoglycoside antibiotic JI-20A fermentation. The optimal medium consists mainly of cornstarch 60g/L, peanut meal 30g/L, corn slurry 8g/L, maltose 10g/L, inorganic compound and amylase moderate, methionin 1g/L and cobalt chloride 6 $\mu$ g/mL. It was significant to adjust medium pH after autoclaving and oxygenate the fermentation medium for the cell growth and JI-20A product.

**Key words:** Antibiotic JI-20A, Aminoglycoside antibiotics, Fermentation, Medium, Optimization

\* 福建省教委资助项目 (No. K20011)

\*\* 联系人 Tel: 0591-7893046, E-mail: JF99chen@public. fj. cn

收稿日期: 2001-05-09, 修回日期: 2001-08-13

氨基糖甙类抗生素 JI-20A 是小单孢菌生物合成西索霉素 (Sisomicin)、抗生素 G-418、相模湾霉素 (Sagamicin)、威大霉素和庆大霉素过程中的中间产物<sup>[1]</sup>, 因此, 凡能够产生上述抗生素的菌种, 都会产生抗生素 JI-20A。

美国的 Testa<sup>[2]</sup> 和日本的 Kase<sup>[3]</sup> 先后对庆大霉素类抗生素的生物合成途径提出了假设、实验和分析, 提出了形成抗生素 G-418、抗生素 JI-20A、相模湾霉素、西索霉素和庆大霉素等多种氨基糖甙类抗生素的生物合成途径。通过菌种的选育和发酵工艺条件的优化, 可望改变抗生素 JI-20A 在发酵液中的浓度比例, 使其上升为发酵的主要产物, 达到提高抗生素 JI-20A 产量的目的。

本文报道了诱变菌株 F002 的分批发酵培养基和发酵工艺的优化研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

实验中使用的是伊尼奥小单孢菌 (*Micromonospora inyoensis* F002, 为本所保存菌种, JI-20A 可达抗生素总量的 53% 以上)。

### 1.2 培养基与培养条件

斜面培养基: 可溶性淀粉, 硝酸钾, 氯化钠, 麸皮, 琼脂, 碳酸钙, 硫酸镁, 天门冬氨酸, 磷酸氢二钾, 消前调 pH 值至 7.0。接种后于 37℃ 培养 8~10d, 新鲜斜面冷藏 (0℃~4℃) 3~7d 后备用。

种子培养基: 玉米淀粉, 黄豆饼粉, 工业蛋白胨, 酵母粉, 硫酸镁, 碳酸钙, 消前调 pH 值至 7.0。接种后于 BIOSTAT 多功能摇床 (德国贝朗公司产品) (35℃, 230r/min) 培养 48h 后移种。

摇瓶出发培养基: 淀粉 50g, 酵母粉 20g, 蛋氨酸 2g, 淀粉酶适量, 复合无机盐适量, 氯化钴 0.004g, 定容 1L, 消后调 pH 值至 6.5~7.0。500 mL 三角瓶装液量为 50mL, 接种量 10%, 接种后于 BIOSTAT 多功能摇床上 (32℃, 240r/min) 发酵至 112 h 结束。

### 1.3 分析方法

产物效价采用薄层层析生物显影法测定<sup>[4]</sup>, 检定菌为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 63202。

还原糖和总糖测定用斐林-碘量法<sup>[5]</sup>。氨基氮和铵离子采用脲酶-Berthelot 试剂盒 (卫生部上海生物制品研究所), 测定波长 630nm, 比色。粘度采用 NDJ-79 型旋转粘度计测定, 3 号转子, 30r/min。丙酮酸测定用 2, 4-二硝基苯肼比色法<sup>[5]</sup>, 测定波长 520nm。

淀粉酶活力测定采用高效液相色谱法 (BACKMAN SYSTEM GOLD HPLC), 测定条件采用 250mm × 4.6mm C18 色谱柱 (BACKMAN 公司产品), 重蒸水为流动相, 流速为 0.8mL/min, 柱压为 1.6 ± 0.1MPa, 柱温为 32 ± 0.5℃。测定样品的处理: 取某一发酵时间的发酵液经 4000r/min 离心 10min, 上清液加入 1% 可溶性淀粉后分成两份, 对照份直接加两滴浓硫酸使发酵液 pH = 1.8~2.5 终止酶反应, 样品份 (约 5mL) 经 32℃ 保温 15min 后, 也加两滴浓硫酸使发酵液 pH = 1.8~2.5 终止酶反应。分别测定对照和样品中麦芽糖的含量, 计算淀粉酶活力。酶活单位 (U/mL) 定义为 100mL 发酵液在 32℃, 于 15min 内生成 1mg 的麦芽糖为 1 个单位。

菌浓测定采用细胞干重法, 发酵液经离心 (4000r/min, 20min) 制备的沉淀物, 用

生理盐水重复离心洗涤2次,收集白色沉淀物于105℃烘干至恒重后称重,单位mg/mL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基的筛选

**2.1.1 碳源的影响:** (1) 淀粉种类对 JI-20A 合成的影响: 实验中分别选择了土豆淀粉、玉米淀粉、可溶性淀粉和糊精, 作为出发培养基的碳源组成, 同时添加 5g/L 葡萄糖, 使消后各培养基还原糖为 12~13g/L, 其它条件同摇瓶出发培养基。研究结果显示, 在这 4 种培养基中, 菌体均能较好地生长和合成抗生素 JI-20A, 以玉米淀粉最佳, 发酵结束时效价达 478 $\mu$ g/mL。

表 1 玉米淀粉用量对 JI-20A 合成的影响

玉米淀粉用量 (g/L)	40	60	80	100
效价 ( $\mu$ g/mL)	268	394	370	302
菌浓 (mg/mL)	28.3	36.7	38.0	41.2
丙酮酸 (mg/mL)	0.324	0.395	0.413	0.528
pH	7.39	7.20	7.19	7.01
粘度 (厘泊)	588.6	1004.6	1086.3	1530.7
残糖 (g/L)	11.0	30.0	33.4	48.4
总糖利用率 (%)	78.6	61.4	60.7	51.9

注: 为 3 或 6 个样品的平均值, 菌浓为生长期结束时 (约 48h) 的测定值, 其余参数均为发酵结束时的测定值 (下文中若未经说明同此)

(2) 玉米淀粉用量对 JI-20A 合成的影响: 改变玉米淀粉用量, 其它条件同 1.2 研究结果 (表 1) 显示, 随着培养基中玉米淀粉用量的增加, 菌浓相应增加, 发酵结束时发酵液粘度和残糖也呈上升趋势, 但 pH 值和发酵过程总糖利用率却在相应下降。当初始培养基中淀粉浓度为 60g/L 时效价最高, 达 394 $\mu$ g/mL; 而 40g/L 时的效价低至 268 $\mu$ g/mL, 这可能与培养基中碳源不足导致发酵后期营养匮乏有关; 当初始培养基中淀粉浓度为 100g/L 时的低效价 (302  $\mu$ g/mL) 可能与培养基中淀粉过剩有关, 它将导致发酵液粘度过大, 从而影响发酵过程的传质和供氧, 以及易形成丙酮酸等酸性物质的累积, 改变了菌体的正常发酵 pH 环境, 影响了菌体对底物的利用速度和细胞结构, 从而抑制了菌体的正常产物合成, 导致发酵结束时 pH 值和总糖利用率降低, 残糖升高, 发酵液粘度超标, 发酵单位降低。

(3) 麦芽糖添加量对 JI-20A 合成的影响: 在进行淀粉酶酶活和糖耗的关联研究中发现, F002 菌种对淀粉酶及其水解产物很敏感, 在发酵初始培养基中淀粉酶用量和玉米淀粉的用量均不能太大, 否则将严重影响到菌体的正常生长, 甚至使迟滞期延长到 20h 以上, 导致染菌的机率大幅度增加, 同时 5L 罐发酵研究显示, F002 菌种在发酵过程中自身的水解酶系不象其它的氨基糖甙类抗生素那么丰富, 酶活除在 20~30h 有一个高峰外, 在发酵过程的其它阶段均较低。因此, 选择了添加麦芽糖来改善发酵初始阶段还原糖的浓度, 力争能缩短菌体生长迟滞期, 其余条件同 1.2 (图 1)。

结果表明, 添加麦芽糖有助于效价和菌浓的提高, 当麦芽糖添加量为 10~30g/L 时, 效果最佳, 菌浓接近 44mg/mL, 发酵结束时效价可达到 480  $\mu$ g/mL 以上。

根据上述研究结果, 选择玉米淀粉 60g/L 和麦芽糖 10g/L, 作为分批发酵培养基碳源组成 (其它条件同出发培养基) 用于后续研究。

**2.1.2 氮源的影响:** (1) 氮源种类对 JI-20A 合成的影响: 实验中选择了花生饼粉、酵母粉、蛋白胨、玉米浆和鱼粉, 每一种培养基的氮源均以 20g/L 花生饼粉的含氮量折算后加入, 使每一种氮源的含氮量基本接近, 其余成分不变。研究结果表明 (数据未给出), 在这 5 种培养基中菌体生长和抗生素合成均较好, 各氮源用于抗生素 JI-20A 发酵

的合适度依序为：酵母粉 > 蛋白胨 > 鱼粉 > 玉米浆 > 花生饼粉。但鉴于工业化生产成本的考虑，选择花生饼粉为分批发酵培养基的主要氮源，添加玉米浆作为补充。

(2) 花生饼粉用量对 JI-20A 合成的影响：仅改变培养基中花生饼粉用量，从研究结果(图 2) 可以看出，随着初始培养基中花生饼粉用量的提高，菌浓逐渐增加，当花生饼粉为 35g/L 时效价达峰值 456 $\mu\text{g/mL}$ ，这种现象可能与高的含氮量有利于菌体生长，却抑制 JI-20A 的合成有关。从抗生素 JI-20A 的合成途径<sup>[1-3]</sup> 可以发现，该合成过程包括多步氮转移反应，如中间代谢物 2-脱氧青蟹肌醇胺，2-脱氧链霉素，巴龙胺和抗生素 JI-20A 本身的合成均需要适当浓度的氨基供体(如各种氨基酸等)。因此，花生饼粉用量可选为 30~40g/L。鉴于成本考虑，最后选择花生饼粉 30g/L 和玉米浆 8g/L 作为分批发酵培养基的氮源组成用于后续的研究。

## 2.2 甲基化因子的影响

### 2.2.1 氯化钴用量对 JI-20A 合成的影响：改变培

培养基中氯化钴用量，其余成分不变。结果表明(表 2)，适量的氯化钴(4~10 $\mu\text{g/mL}$ )有助于 JI-20A 产量的提高，发酵结束时发酵液 pH 值和粘度适中。但添加氯化钴过量( $\geq 20\mu\text{g/mL}$ )时会产生毒性效应，发酵液发红，甚至变成紫褐色，菌丝过早发生自溶，72h 镜检时菌体出现疏松的散枝，染色变浅，发酵后期发酵液变稀，发酵结束时 pH 值升至 7.5 以上，效价较低。

表 2 氯化钴用量对 JI-20A 合成的影响

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	2	4	6	8	10	20	30
效价 ( $\mu\text{g/mL}$ )	340	418	468	485	474	477	380	276
pH	6.7	7.08	7.23	7.16	7.21	7.25	7.45	8.03
粘度 (厘泊)	1282.3	940.6	880.5	892.0	956.4	914.8	730.9	326.0

一般地，抗生素 JI-20A 及其副产物的合成主要发生在发酵中后期，为中间分支代谢物，JI-20A 的杂质为其合成途径中的前体物质或支路产物，作为微量元素的钴离子是该合成代谢途径中 4' C 位和 6' C 位甲基化的辅助因子。在对庆大霉素的研究中也发现<sup>[6]</sup>，发酵培养基中不加钴离子，庆大霉素效价会降至正常发酵的 20%，并且形成的是极性小组分庆大霉素 A，虽然钴离子并不影响庆大霉素 6' C 位的氨基化和 6' N 位的甲基化，但 6' C 位甲基化和 4' C 位甲基化必需有钴离子参加。因此，本研究选择发酵培养基中外加氯化钴用量为 6 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.2 蛋氨酸用量对 JI-20A 合成的影响：改变培养基中蛋氨酸用量，其余成分不变，考察蛋氨酸用量对 JI-20A 合成的影响。图 3 研究结果显示，提高初始培养基中蛋氨酸

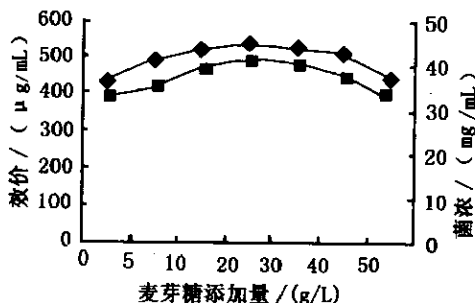


图 1 麦芽糖添加量对 JI-20A 合成的影响

■ 效价 ( $\mu\text{g/mL}$ ), ◆ 菌浓 (mg/mL)

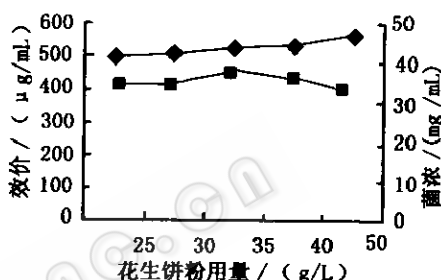


图 2 花生饼粉用量对 JI-20A 合成的影响

■ 效价 ( $\mu\text{g/mL}$ ), ◆ 菌浓 (mg/mL)

的用量, 效价和菌浓均随之提高, 在蛋氨酸用量为 2~4g/L 时效价基本恒定, 可达 470~490 $\mu\text{g/mL}$ 。

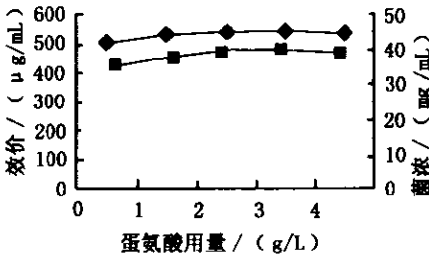


图3 蛋氨酸用量对 JI-20A 合成的影响  
■ 效价 ( $\mu\text{g/mL}$ ), ◆ 菌浓 (mg/mL)

有研究表明<sup>[7]</sup>, 在氨基糖甙类抗生素(如庆大霉素, 新霉素和链霉素)的生物合成时, 谷氨酸、谷氨酰胺和葡糖胺等氨基供体能刺激抗生素的形成, 虽然其机制并未阐明, 但在抗生素 JI-20A 的发酵过程中也存在着相同的氮流类似作用。蛋氨酸既能作为氨基糖甙类抗生素发酵时的氨基供体, 又作为抗生素甲基化的一种常用的辅助因子, 在发酵过程中应提供足量的蛋氨酸, 满足抗生素 JI-20A 正常生物合成的

要求。由于本研究所选用的花生饼粉和玉米浆原料中蛋氨酸的含量分别为 0.6% 和 2.1%, 因此分批发酵培养基中添加 1g/L 蛋氨酸已能满足要求。

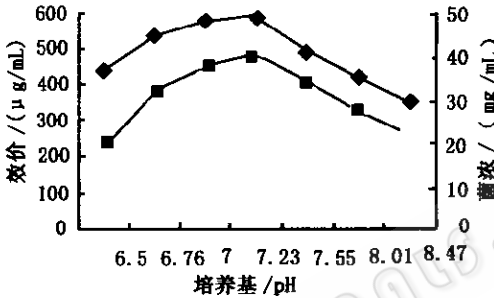


图4 培养基初始 pH 值的影响  
■ 效价 ( $\mu\text{g/mL}$ ), ◆ 菌浓 (mg/mL)

### 2.3 培养条件的影响

2.3.1 培养基初始 pH 值的影响: 实验结果(图 4)显示, 随着消后培养基的 pH 值的升高, 抗生素 JI-20A 产生菌的菌体生长和产物合成能力均显著变化, 在 pH 7.0~7.23 范围内的效果最佳, 菌浓可达到 49mg/mL, 效价为 456~484 $\mu\text{g/mL}$ 。这可能与抗生素 JI-20A 为有机生物碱有关, 通常微碱性条件有助于弱碱性抗生素产生菌的菌体生长和产物合成。至于

pH 的作用机理不详, 有待进一步的研究。

2.3.2 供氧条件对 JI-20A 合成能力的影响: 抗生素 JI-20A 的发酵生产是一个需氧过程。由于摇瓶发酵时无法直接测定培养过程的溶氧浓度变化, 通过改变摇瓶机搅拌转速和 500mL 锥形

表3 供氧条件对 JI-20A 合成能力的影响

搅拌转速 (r/min)	180	240	300	350		
效价 ( $\mu\text{g/mL}$ )	258	479	496	487		
装液量 (mL)	20	40	50	60	70	80
效价 ( $\mu\text{g/mL}$ )	干掉	485	476	434	382	279

瓶装液量来间接了解供氧条件对 JI-20A 合成能力的影响。

研究结果(表 3)显示, 随着搅拌转速的提高, 效价明显增加, 当转速为 240~350r/min 时, 效价恒定于 480 $\mu\text{g/mL}$  以上。随着装液量的增加, 效价逐渐减少, 其中装液量为 20mL 时较易于干掉, 装液量为 40~60mL 时基本上能达到实验的要求, 效价在 430 $\mu\text{g/mL}$  以上, 当装液量  $\geq 70\text{mL}$  时, 因供氧不足效价反而下降。因此, 在工业化生产时应注意发酵过程中的溶氧浓度的控制。

### 2.4 5L 罐中试验验证实验

在上述摇瓶发酵的研究基础上, 于 BIostat B5 型全自动发酵罐(德国贝朗公司产品)进行分批发酵工艺的验证研究, 5L 罐的装料量为 2.8L, 接种量 12%~13%, 搅拌转速 400r/min, 罐压 1.2 大气压, 通气量 1: 1.05 (V/V/min), 32 $^{\circ}\text{C}$  通气发酵至 115h 结束, 实验结果示于图 5。

实验结果显示,可将抗生素JI-20A的分批发酵过程粗略地分为延滞期、对数生长期和产物合成期等3个阶段。接种后菌体生长的延滞期较短,约为5~11h,此阶段菌体浓度基本保持不变,发酵液中分泌的淀粉酶活性也较低( $\leq 3.00$  U/mL)。之后,菌体迅速进入对数生长期,菌体的比生长速率 $\mu_x$ 和发酵液中的淀粉酶活性均同步上升,分别在23h附近出现峰值 $0.0502$   $h^{-1}$ 和 $26.55$  U/mL,此时在发酵液中并未检测到抗生素JI-20A。随着发酵的进行,菌

体的比生长速率 $\mu_x$ 和淀粉酶活性均迅速下降,当发酵到41h后发酵液中淀粉酶活性基本上稳定在 $5\sim 7$  U/mL左右;当发酵到65h时 $\mu_x$ 开始出现副值,表明菌体生长进入死亡期;当发酵到29h时,在发酵液中开始检测到抗生素JI-20A,表明此时发酵开始转入产物合成期,当发酵到36~41h时,比产物生成速率 $Q_p$ 出现最大值约为 $460.0$   $\mu g/g\cdot h^{-1}$ ,随后就逐渐下降,到发酵结束时发酵液中的 $Q_p$ 降为 $26.0$   $\mu g/g\cdot h^{-1}$ 。

从图5看出,在菌体生长高峰期没有产物形成,仅在菌体比生长速率 $\mu_x$ 开始下降时才出现产物合成高峰,这种代谢特性与Garden分类中所描述的代谢产物合成与菌体生长关系的第3类基本吻合,故认为抗生素JI-20A的发酵过程属于非生长偶联型。

### 3 结 语

根据发酵培养基和发酵工艺的优化结果,选择氨基糖甙类抗生素JI-20A的分批发酵培养条件为:玉米淀粉 $60$  g/L,花生饼粉 $30$  g/L,麦芽糖 $10$  g/L,玉米浆 $8$  g/L,淀粉酶适量,复合无机盐适量,蛋氨酸 $1$  g/L和氯化钴 $6$   $\mu g/mL$ ,控制消后pH值为 $7.0\sim 7.2$ ,接种量为 $10\%$ , $32^\circ C$ , $240$  r/min摇瓶发酵至 $112$  h结束, $500$  mL三角瓶装量 $50$  mL。 $5L$ 罐中试验验证实验结果表明发酵结束时的产物效价可达到 $500$   $\mu g/mL$ 以上,抗生素JI-20A的发酵过程是属于非生长偶联型。

致谢 衷心感谢福州福兴医药有限公司陈灼湖,罗义发和黄凤珠等的大力帮助。

### 参 考 文 献

- [1] Testa R T, Tilley B C. J Antibiotics, 1976, 29: 140~146.
- [2] Testa R T, Tilley B C. J Antibiotics, 1975, 28: 573~579.
- [3] Kase H, Odakura Y, Nakayama K. J Antibiotics. 1982, 35: 1~9.
- [4] 陈剑锋, 郭养浩, 张元兴, 等. 2002, 27 (4): 224~226.
- [5] 西北农业大学主编. 基础生物化学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986. 10~13, 110.
- [6] 褚志义主编. 生物合成药物学. 北京: 化学工业出版社, 现代生物技术与医药科技出版中心. 2000, 608~617.
- [7] Gonzalez R, Islas L, Obregon A M, et al. J Antibiotics, 1994, 48 (6): 479~483.

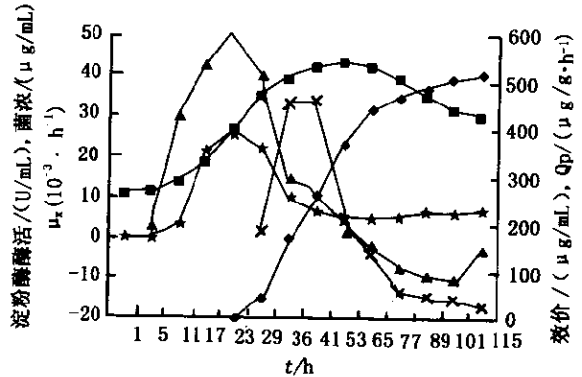


图5 JI-20A分批发酵代谢

■- 菌浓(mg/mL), \* 淀粉酶活(U/mL),  
▲-  $\mu_x(10^{-3} \cdot h^{-1})$ , ◆- 效价( $\mu g/mL$ ), ×-  $Q_p(\mu g/g \cdot h^{-1})$